

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670365

研究課題名(和文) 老化による血管内皮障害に関連する新規ユビキチン系分子の探索及び臨床応用への可能性

研究課題名(英文) Functional screening for novel molecules related to endothelial dysfunction in the ubiquitin system and the potential of their clinical application.

研究代表者

樂木 宏実 (Hiromi, Rakugi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20252679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 遺伝子機能スクリーニングを用いて血管内皮由来cDNAライブラリーより線維芽細胞にて酸化ストレスを増強させる液性因子であり、かつユビキチンの基質蛋白であるAnnexinA1 (ANXA1)を見出した。ANXA1は抗炎症分子であると報告されているが、酸化ストレスにより細胞老化が誘導された環境においては切断を受け、C末端側の断片が炎症を惹起していると想定している。現在、このANXA1のC末端断片により酸化ストレスが惹起され、血管内皮の細胞老化を誘導し、細胞老化随伴分泌現象に関与する炎症性分子の分泌を増強することにより血管内皮障害を端緒とする各種加齢性疾患へ関与しているかについて検討中である。

研究成果の概要(英文)： We found the ubiquitin system-related secretory molecule AnnexinA1 (ANXA1) derived from cDNA library of vascular endothelial cell by the functional gene screening for factors inducing oxidative stress in human dermal fibroblast. Although ANXA1 has been reported to be anti-inflammatory molecule, we speculated ANXA1 was cleaved in the milieu in which cell senescence was induced by oxidative stress and C-terminal fragment of ANXA1 (CT-ANXA1) showed proinflammatory action. CT-ANXA1-induced oxidative stress could evoke cell senescence and enhance secretion of inflammatory molecules in endothelial cells, potentially leading senescence-associated secretory phenomenon (SASP). Currently, we are investigating the pathological contribution of CT-ANXA1 on the various age-related diseases initiated by vascular endothelial dysfunction associated with SASP.

研究分野：老年医学

キーワード：老化 血管内皮 ユビキチン系 遺伝子機能スクリーニング 加齢性疾患 Annexin A1

1. 研究開始当初の背景

我々は独自に開発した遺伝子機能スクリーニング法を用いて、血管内皮に内在する脱ユビキチン化酵素 (UCHL1、CYLD) が炎症の制御分子となり得ることを初めて報告した (Takami Y et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 & Am J Pathol. 2008)。これらの研究ではユビキチンシステムが血管リモデリングなどの急性変化に対し、炎症の中心的役割を担うNF- κ B 活性を制御するための“ブレーキ”としても作用することを明らかにし、また、細胞老化による発現の減少が老化による動脈硬化形成へ関与することが示唆された。また、脱ユビキチン化標的蛋白の解析を進めていく過程で、パーキンソン病の原因物質である α -シヌクレイン (SNCA) が血管内皮細胞にも発現し、かつ分泌されていることを見出し、更にはSNCA の血中濃度も加齢とともに減少し、それが高血圧や血管内皮機能障害、インスリン抵抗性に強く関連していることを発見した。ユビキチンシステムによる細胞内蛋白のクオリティーコントロールは加齢により障害を受け、酸化ストレスや小胞体ストレスの悪化を引き起こし、更に細胞老化を惹起するが (Kourtis N et al. EMBO J. 2011)、SNCA の分泌障害や細胞内凝集体のクリアランス低下にも関連していることを見出した。

以上より血管内皮におけるユビキチン系分子やその標的分子は老化や老化関連疾患に多大に関連している可能性が示唆され、多岐に渡るため、同様に機能する分子の存在が想定される。

2. 研究の目的

超高齢社会を迎えた我が国では健康寿命の延伸が重要課題であり、その実現には心血管疾患に対する早期からの治療介入が必須である。ユビキチンシステムは標的蛋白の分解を始め、シグナル伝達や細胞内局在など多彩な生理機能を司るが、その機能異常は酸化ストレスや小胞体ストレスによる細胞老化

を促進し、様々な加齢性疾患への関与が想定される。前述のごとく、我々は脱ユビキチン化酵素やその標的分子の一つである α -シヌクレインが老化に関連し、血管内皮機能の維持に重要な役割を担っていることを見出した。本研究ではこれら先行結果に基づき、老化に伴う心血管疾患の進展において中心的な役割を担う血管内皮障害を鋭敏に反映するバイオマーカーやその病態に関連する創薬標的分子について血管内皮におけるユビキチン系関連分子に焦点を絞り探索、機能解析することを目的とする。

3. 研究の方法

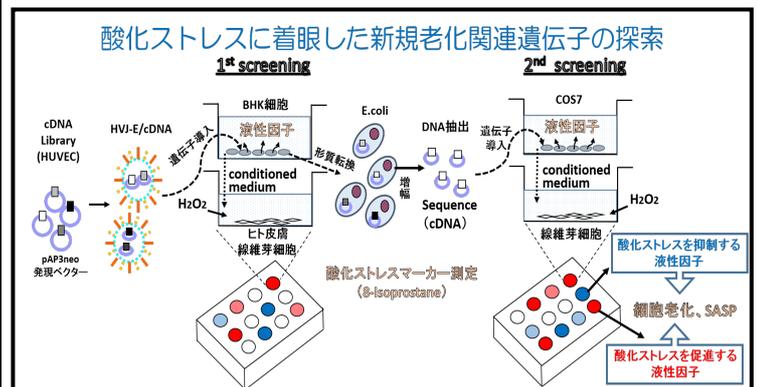


図1 遺伝子機能スクリーニングの概要

解析対象とする液性因子の探索に際しては独自に開発したHVI-Eベクターを用いた遺伝子機能スクリーニング法 (Hum Gene Ther. 2006Apr;17(4):470-5.) を用いた。HUVEC の cDNA ライブラリーを HVI-E を用いて BHK 細胞に遺伝子導入し、その培養上清を H2O2 で刺激したヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) に添加後、培養上清中の酸化ストレスマーカー (8-isoprostane 濃度) を測定した (1st スクリーニング)。更に 8-isoprostane を指標とした酸化ストレスが最も促進または抑制された well から抽出したプラスミドを大腸菌に形質転換、増幅させることによりシングルクローン化した後、個々のプラスミドを COS7 に遺伝子導入し、その培養上清を H2O2 で刺激した NHDF に添加し 8-isoprostane を測定

した(2nd スクリーニング)(図1)。次に個々のプラスミドに含まれる cDNA のシーケンスを行い、候補遺伝子をリスト化し、その中から酸化ストレスを増強させる液性因子であり、かつユビキチンの基質蛋白である分子を本研究における解析対象とした。

4. 研究成果

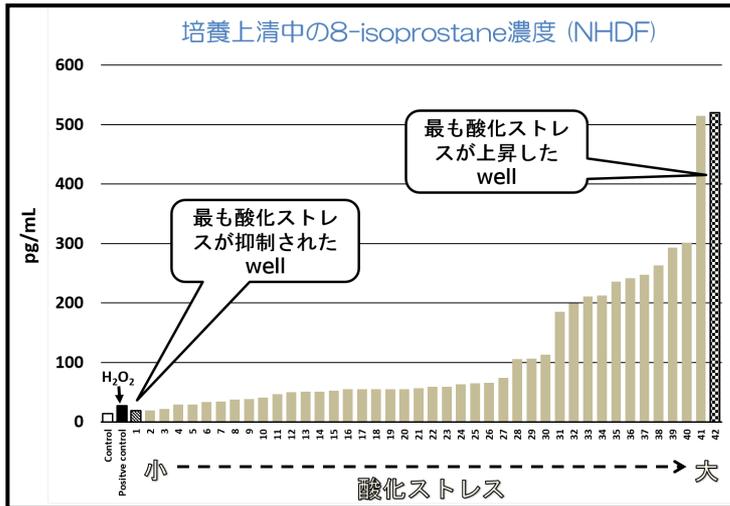


図2 1st スクリーニングの結果

図2に1st スクリーニングの結果を示す。

更に8-isoprostaneを指標とした酸化ストレスが最も促進または抑制されたwellから抽出したプラスミドを大腸菌に形質転換、増幅させることによりシングルクローン化した後、個々のプラスミドをCOS7に遺伝子導入し、その培養上清をH₂O₂で刺激したNHDFに添加し8-isoprostaneを測定した(2nd スクリーニング、図3、図4)。

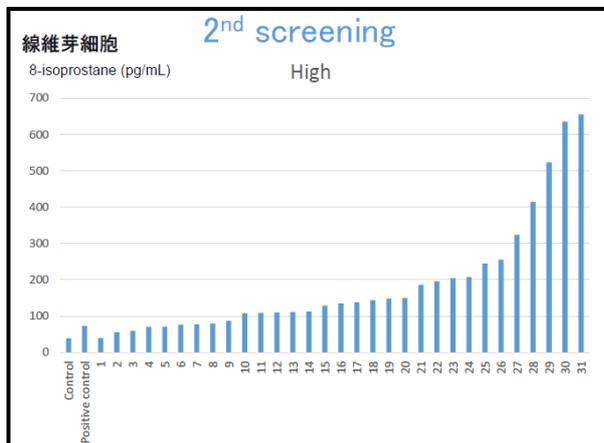


図3 最も高い酸化ストレスを示したwellでの2nd スクリーニング

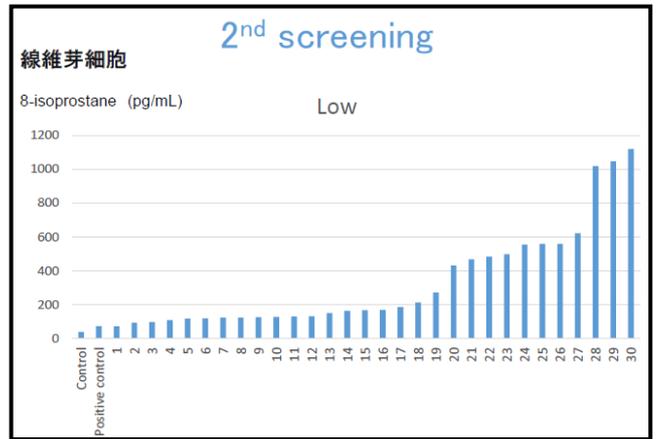


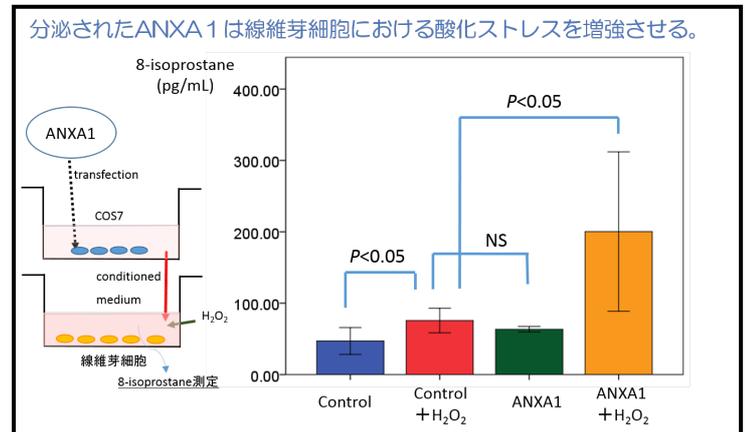
図4 最も低い酸化ストレスを示したwellでの2nd スクリーニング

次に個々のプラスミドに含まれる cDNA のシーケンスを行い、候補遺伝子をリスト化し、その中から酸化ストレスを増強させる液性因子であり、かつユビキチン化およびSUMO化の基質蛋白であるANXA1を見出し、本研究における解析対象とした(下表、図5)。

図5 線維芽細胞におけるANXA1の酸化スト

候補遺伝子
Homo sapiens clone HTL-S-25 testicular secretory protein Li 25 mRNA, complete
Homo sapiens ribosomal protein SA, mRNA
Homo sapiens annexin A1 (ANXA1), mRNA
Synthetic construct Homo sapiens clone ccsbBroadEn_06616 NARS gene, encodes complete protein
Homo sapiens protein disulfide isomerase family A member 3 (PDIA3), mRNA
Homo sapiens matrix metalloproteinase 1 (MMP1), transcript variant 2, mRNA
Homo sapiens single-pass membrane protein with coiled-coil domains 4 (SMCO4), mRNA
Panthera pardus elongation factor 1-alpha 1, mRNA
Homo sapiens telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1, mRNA
Homo sapiens heat shock protein family A (Hsp70) member 8 (HSPA8), transcript variant X1, mRNA
Homo sapiens AD039 mRNA, complete cds
Panthera pardus elongation factor 1-alpha 1 (LOC109261840), mRNA

レス増強作用



また、ANXA1を過剰発現させたCOS7の培養上清を濃縮し、ウエスタンブロットを行った

ところ、図6に示すように、cleavageを受け
たと思われる2本のバンドが検出された。

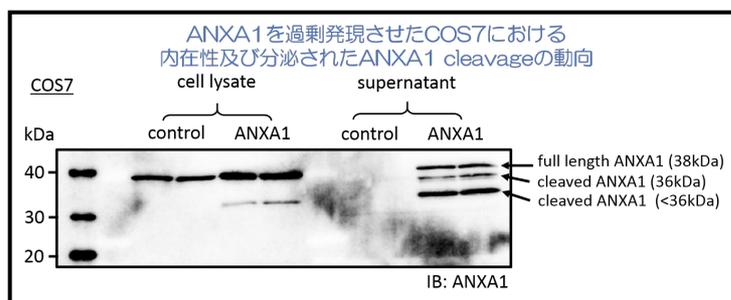


図6 ANXA1を過剰発現させたCOS7の濃縮した培養上清のウエスタンブロット

ANXA1は炎症性細胞においてGlucocorticoidにより発現が誘導され、cytosolic phospholipase A2やcyclooxygenase2の活性を抑制する抗炎症分子であると報告されている(*Nat Rev Immunol*.9(1):62-70, 2009)。しかし、我々の検討では酸化ストレスにより細胞老化が誘導(stress-induced premature senescence)された環境においてはANXA1が酸化ストレスを増悪させる因子となる可能性を見出した。その理由として酸化ストレスによりCa²⁺依存性システインプロテアーゼであるCalpain1が活性化、分泌されたことによりANXA1がcleavageを受け、炎症作用を有するC末端側の断片(36kDa)が増加したためと推測している(*J Immunol*.185:3057-3063, 2010)。また、図6に示すように培養上清にはANXA1の断片と思われる36kDa未満のバンドが検出され、N末端の断片も含めて、病態での意義を今後検討する必要がある。

以上より最大の内分泌器官である血管内皮より分泌されるANXA1はcleavageを受けることで線維芽細胞と同様に加齢に伴う血管内皮での酸化ストレスを悪化させ、血管内皮の細胞老化を誘導、更には細胞老化関連分泌現象(Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP))による炎症性分子の分泌を増強することにより血管内皮障害を端緒とする加齢性の心血管疾患、代謝性疾患の病態に関与していると想定している。今後、更

なる基礎的検討を行い、臨床的にも各種加齢性疾患に対するバイオマーカーとしての有用性について血液検体中の断片を含むANXA1を測定することで検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/geriat/www/jgrpb.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楽木 宏実 (RAKUGI Hiromi)
大阪大学大学院医学系研究科 老年・総合内科学 教授
研究者番号：20252679

(2) 研究分担者

鷹見 洋一 (TAKAMI Yoichi)
大阪大学大学院医学系研究科 老年・総合内科学 助教
研究者番号：90621756

(3) 研究分担者

中神 啓徳 (NAKAGAMI Hironori)

大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座
教授
研究者番号：20325369

(4)連携研究者

金田 安史 (KANEDA, Yasufumi)
大阪大学大学院医学系研究科 ゲノム生
物学講座 遺伝子治療学分野 教授
研究者番号：10177537